

The Delphion Integrated View

Get Now:  PDF | File History | Other choices

Tools: Add to Work File: Create new Work

View: Expand Details | INPADOC | Jump to: Top

 Go to: Derwent

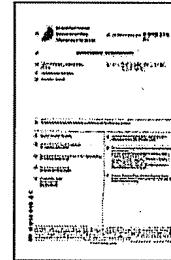
 Email

>Title: **EP0018515B1: Process for the preparation of chenodeoxycholic acid intermediate products** [German][French]

Derwent Title: Norcholane derivs. from 3-keto-bis:norcholenol - useful as intermediates for chenodeoxycholic acid [\[Derwent Record\]](#)

Country: EP European Patent Office (EPO)

Kind: B1 Patent (See also: [EP0018515A2](#), [EP0018515A3](#))



Inventor: Despreaux, Carl;
Narwid, Thomas Albert;
Palleroni, Norberto J.;
Uskokovic, Milan R.;

Assignee: F. HOFFMANN-LA ROCHE & CO. Aktiengesellschaft
Corporate Tree data: Roche HoldingLtd. (ROCHE);
News, Profiles, Stocks and More about this company

Published / Filed: 1982-10-27 / 1980-04-09

Application Number: EP1980000101893

IPC Code: Advanced: C07J 9/00; C07J 31/00; C12P 33/06;
Core: C12P 33/00; more...
IPC-7: C07J 9/00; C07J 31/00; C12P 33/06;

Priority Number: 1979-04-12 US1979000029420

Abstract: [From equivalent EP0018515A3] SDOAB
A multi-step synthesis of chenodeoxycholic acid from 3-keto-bisnorcholenol, a compound readily obtained from the abundant plant sterol beta-sitosterol, is described. A key step in the synthesis is the stereoselective microbial introduction of the 7-alpha hydroxy group into 3-keto-bisnorcholenol.

Attorney, Agent or Firm: Lederer, Franz, Dr. et al ;

INPADOC Show legal status actions Get Now: Family Legal Status Report

Legal Status: AT BE CH DE FR GB IT LI NL
Designated Country:

Family:

PDF	Publication	Pub. Date	Filed	Title
	US4301246	1981-11-17	1980-01-18	Process for chenodeoxycholic acid produ
	US4230625	1980-10-28	1979-04-12	Process for chenodeoxycholic acid and intermediates therefore
	JP56008399A2	1981-01-28	1980-04-11	KENODEOKISHIKOORUSANNOSEIZOF

<input type="checkbox"/>	EP0018515B1	1982-10-27	1980-04-09	Process for the preparation of chenodeo x acid and intermediate products
<input type="checkbox"/>	EP0018515A3	1981-01-07	1980-04-09	Process for the preparation of chenodeo x acid and intermediate products
<input type="checkbox"/>	EP0018515A2	1980-11-12	1980-04-09	Process for the preparation of chenodeo x acid and intermediate products
				PROCESS FOR THE PREPARATION OF CHENODEOXYCHOLIC ACID AND INTERMEDIATE PRODUCTS
<input checked="" type="checkbox"/>	DE3060991C0	1982-12-02	1980-04-09	VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG VON CHENODEOXYCHOLSAEURE UND ZWISCHENPRODUKTE DAZU.

8 family members shown above

 Forward References:

[Go to Result Set: Forward references \(1\)](#)

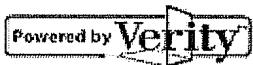
PDF	Patent	Pub.Date	Inventor	Assignee	Title
<input type="checkbox"/>	US6933383	2005-08-23	Kinney; William A.	Genaera Corporation	Regioselective and stereoselective oxidation of fused ring systems in the preparation of aminosteroids

 Other Abstract Info:

[CHEMABS 095\(01\)007603U](#)



Nominate this for the Gallery...



THOMSON

Copyright © 1997-2006 The Tho

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#)

⑨ 日本国特許庁 (JP)
 ⑩ 公開特許公報 (A)

⑪ 特許出願公開
 昭56—8399

⑫ Int. Cl.³
 C 07 J 9/00
 // C 12 P 33/06.

識別記号

厅内整理番号
 6408—4C
 6712—4B

⑬ 公開 昭和56年(1981)1月28日
 発明の数 7
 審査請求 未請求
 (全 14 頁)

⑭ ケノデオキシコール酸の製造方法

⑮ 特 願 昭55—47936

⑯ 出 願 昭55(1980)4月11日

優先権主張 ⑰ 1979年4月12日 ⑲ 米国(US)
 ⑳ 29420

㉑ 発明者 ガール・デスブリークス
 アメリカ合衆国ニュージャージ
 一州シーダー・グローブ・ダニ
 エル・ドライブ23
 ㉒ 発明者 トマス・アルバート・ナーウ
 イツド
 アメリカ合衆国ニュージャージ

㉓ 発明者 ノーベルト・ジエイ・パレロニ
 アメリカ合衆国ニュージャージ
 一州ノース・ゴールドウエル・
 ホワイト・オーク・ドライブ47

㉔ 出願人 エフ・ホフマンーラ・ロシエ・
 ウント・コンパニー・アクチエ
 ンゲゼルシャフト
 スイス国バーゼル・グレンツア
 ヒエルシュトラーセ124-184
 ㉕ 代理人 弁理士 浅村皓 外4名
 最終頁に続く

明細書の抄本(内容に変更なし)
 明細書

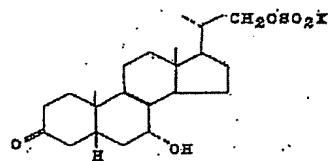
1.発明の名称

ケノデオキシコール酸の製造方法

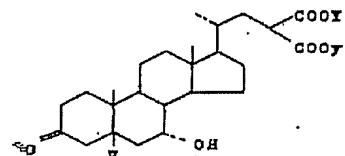
2.特許請求の範囲

(1) (5 α) - 24-ノルコラン-3 α ; 7 α -
 ジオール-23, 23-ジカルボン酸を熱脱炭酸
 に付すことを特徴とするケノデオキシコール酸の
 製造方法。
 (2) 出発原料である(5 α) - 24-ノルコラン
 -3 α , 7 α -ジオール-23, 23-ジカルボ
 ン酸は、(4) 3-ケト-ビスノルコレノールを
Botryodiplodia theobromae IFO 6469, DSM
 62-678, DSM 62-679; Lasioidiplodia
theobromae ATCC 28570; Botryosphaeria
ribis ATCC 22802, B. berengueriana ATCC
 12557, B. rhodina CBS 374-54, CBS
 287-47およびCBS 306-58から選ばれ
 る微生物またはその酵素抽出液によつて7 α -ヒ
 ドロキシル化して7 α -ヒドロキシ-3-ケトビ
 斯ノルコレノールに導き、(5) この7 α -ヒドロキ

シ-3-ケトビスノルコレノールをバラジウム触媒の存在下に水素添加して(5 α) - 7 α , 22-
 ヒドロキシ-23, 24-ビスノルコラン-
 3-オンに導き、(6) 工程(4)の生成物をメチルまたは
 メトトリルスルホエルハライドから選ばれるス
 ルホニルハライドと反応させて、式

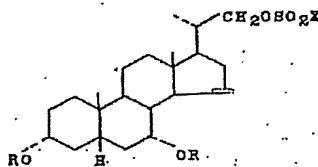


(式中Rはメチルまたはメトトリルである)で示
 される化合物を得、ついで(7)この工程(6)の生成物
 をマロン酸ジC₁₋₃アルキルエステルナトリウム
 塩と反応させて、式

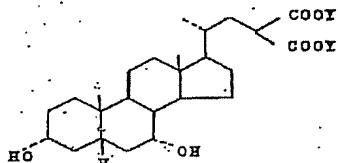


特開昭56- 8399(2)

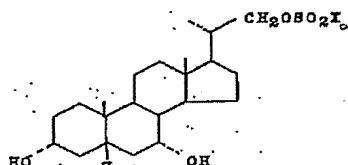
合物に導き、(Ⅱ)工程の生成物をステロイド化学においてヒドロキシ基の保護に常用されるアシル化剤の2倍モル過剰以上と反応させて式



(式中YはC₁₋₃アルキルである)で示される化合物を得、(Ⅲ)工程における生成物を化学還元剤で処理して式



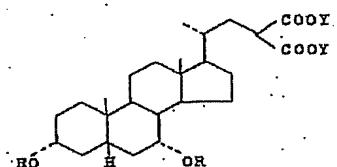
(式中YはC₁₋₃アルキルである)で示される化合物を得、(Ⅳ)工程における生成物を強塩基で加水分解して(5β)-24-ノルコラン-3α, 7α-ジオール-23, 23-ジカルボン酸を得るか、または(Ⅴ)工程の生成物を化学還元剤と反応させて式



(Yは先に定義したと同じである)で示される化

3

(Yは先に定義したと同じであり、Rはアシルである)で示される化合物を得、(Ⅵ)工程の生成物をマロン酸ジC₁₋₃アルキルエステルナトリウム塩と反応させて式



(式中YはC₁₋₃アルキルであり、Rは先に定義したと同じである)で示される化合物を得、(Ⅶ)工程の生成物を強塩基で加水分解して(5β)-

4

24-ノルコラン-3α, 7α-ジオール-23, 23-ジカルボン酸に導く方法により製造する特許請求の範囲第1項記載の製造方法。

(6) Yはカートリル、Xはメチルまたはエチル、Rはアセチルである特許請求の範囲第2項記載の製造方法。

(4) 7α-ヒドロキシル化の間には吸着剤を存在させる特許請求の範囲第2項記載の製造方法。

(5) 吸着剤はアクリル酸メチルエステルのポリマーであつて最終濃度0.3ないし0.6質量%で存在させ、3-ケト-1-ビスノルコレノールは約1g/gまでの濃度で存在させる特許請求の範囲第4項記載の製造方法。

(6) 7α-ヒドロキシル化の間にはキレート剤を存在させる特許請求の範囲第2項記載の製造方法。

(7) キレート剤は2,2'-ペリジルである特許請求の範囲第6項記載の製造方法。

(8) (5β)-24-ノルコラン-3α, 7α-

ジオール-23, 23-ジカルボン酸。

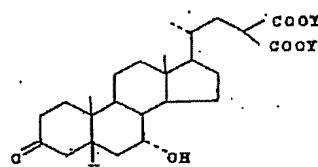
(9) 式

5

(式中YはC₁₋₃アルキルである)で示される化合物。

即ち(5β)-24-ノルコラン-3α, 7α-ジオール-23, 23-ジカルボン酸ジメチルエステルである特許請求の範囲第9項記載の化合物。

即式



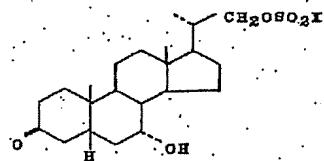
(式中YはC₁₋₃アルキルである)で示される化合物。

即(5β)-24-ノルコラン-3-オン-23, 23-ジカルボン酸ジメチルエステルであ

6

る特許請求の範囲第1項記載の化合物。

図式



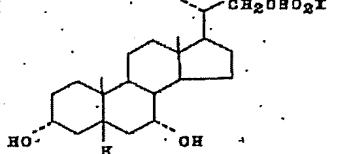
(式中エはメチルまたはプロトリルである)で示される化合物。

図 (5 β) - 7 α -ヒドロキシ-22-[(4-メチルフェニル)スルホニルオキシ]-23, 24-ビスノルコラン-3-オン。

図 (5 β) - 7 α , 22-ジヒドロキシ-23, 24-ビスノルコラン-3-オン。

図 7 α -ジヒドロキシ-23, 24-ビスノルコール-4-エン-3-オン。

図式

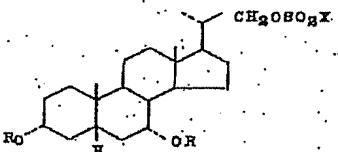


7

(式中エはメチルまたはプロトリルである)で示される化合物。

図 22-[(4-メチルフェニル)スルホニル]オキシ-23, 24-ビスノルコラン-3 α , 7 α -ジオールである特許請求の範囲第1項記載の化合物。

図式

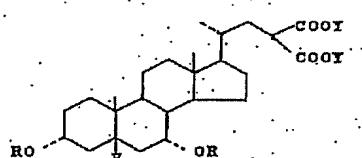


(式中エはメチルまたはプロトリルであり、Rはアシルである)で示される化合物。

図 22-[(4-メチルフェニル)スルホニル]オキシ-23, 24-ビスノルコラン-3 α , 7 α -ジオール-3, 7-ジアセテートである特許請求の範囲第1項記載の化合物。

図式

8

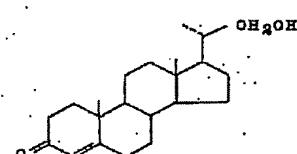


(式中Rはアシルであり、エはC₁-5アルキルである)で示される化合物。

図 5 α , 7 α -ジアセトキシ-23, 24-ノルコラン-23, 23-ジカルボン酸ジエチルエステルである特許請求の範囲第2項記載の化合物。

3.発明の詳細な説明

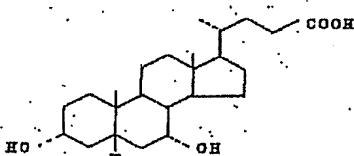
本発明は市販品を容易に入手できるヨーロピストリールを本技術分野でよく知られた方法によつて微生物学的に分解して容易に得られる式



で示される5-ケト-ビスノルコレノール(別名

9

22-ヒドロキシ-23, 24-ビスノルコール-4-エン-3-オン)化合物に出発する。



で示されるケノデオキシコール酸の能率的な合成方法に関する。

本発明の一態様は、(5 β) - 24-ノルコラン-3 α , 7 α -ジオール-23, 23-ジカルボン酸の熱脱炭酸によるケノデオキシコール酸の製造方法である。

本発明の他の態様によれば、(5 β) - 24-ノルコラン-3 α , 7 α -ジオール-23, 23-ジカルボン酸は以下の反応工程により3-ケト-ビスノルコレノールから製造される。

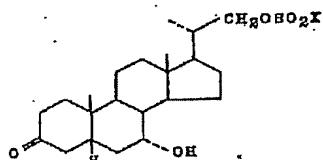
(A) 3-ケト-ビスノルコレノールを
Botryodiplodia theobromae IFO 6469,
DSM 62-678, DSM 62-679;

10

Lasiotrichia theobromae ATCC 28570 ;
Botryosphaeria ribis ATCC 22802 ;
B. berengeriana ATCC 12557 , B. rhodina
CBS 374:54 , CBS 287:47 および CBS
306:58 よりなる群から選ばれる微生物またはその酵素抽出液によつて7α-ヒドロキシル化する工程。

(B) 7α-ヒドロキシ-3-ケト-ビスノルコレノールをパラジウム触媒の存在下に水素添加して(5β)-7α,22-ジヒドロキシ-23,24-ビスノルコラン-3-オンに導く工程。

(C) 工程(B)の生成物をメチルまたはアートリルスルホニルハライドから選ばれるスルホニルハライドと反応させて、式

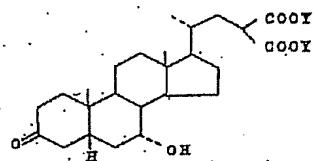


(式中工はメチルまたはアートリルである)で示される化合物を製造する工程。

11

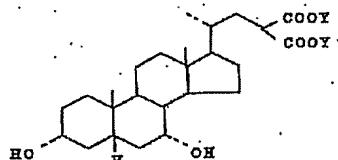
示される化合物を製造する工程。

(D) 工程(C)の生成物をマロン酸ジC₁-3アルキルエステルのナトリウム塩と反応させて式



(式中工はC₁-3アルキルである)で示される化合物を製造する工程。

(E) 工程(D)における生成物を化学還元剤で処理して式



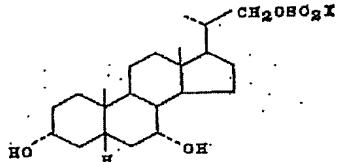
(式中工はC₁-3アルキルである)で示される化合物を製造する工程。

(F) 工程(E)における生成物を強塩基で加水分解し

12

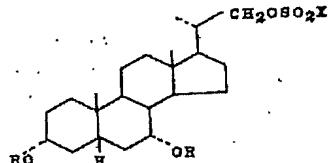
て(5β)-24-ノルコラン-3α,7α-ジオール-23,23-ジカルボン酸を得る工程、または

(G) 工程(F)の生成物を化学還元剤と反応させて式



(式中工は先に定義したと同じである)で示される化合物を製造する工程。

(H) 工程(G)の生成物をステロイド化学においてヒドロキシ基の保護に常用されるアシル化剤の2倍モル以上過剰と反応させて、式

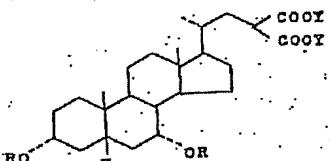


(式中工は先に定義したと同じであり、Rはア

13

シルである)で示される化合物を製造する工程。

(I) 工程(H)の生成物をマロン酸ジC₁-3アルキルエステルのナトリウム塩と反応させて、式

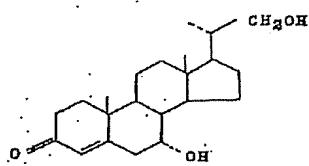


(式中工はC₁-3アルキルであり、Rは先に定義したと同じである)で示される化合物を製造する工程、および

(J) 工程(I)の生成物を強塩基で加水分解して(5β)-24-ノルコラン-3α,7α-ジオール-23,23-ジカルボン酸を製造する工程である。

本発明の第一の製造工程では、3-ケト-ビスノルコレノールの7位を微生物によつてヒドロキシル化し、式

14



圖

で示される 7α-ヒドロキシ-5-ケト-ビスノルコレノール (7α, 22-ジヒドロキシ-23, 24-ビスノルコレル-4-エン-3-オン) を製造する。

各種基質化合物の 7α-ヒドロキシル化が可能であると報告されている 41 種, 92 種, 152 酵株の培養微生物について 7α-ヒドロキシル化を検討したが、予想に反して、わずか 9 種類のきわめて類似した微生物、Botryodiplodia theobromae IFO 64469, ATCC 28570, DSM 62-678, DSM 62-679, Botryosphaeria ribis ATCC 22802, B. berengeriana ATCC 12557, B. rhodina, CBS 574.54, CBS 287.47 および CBS 306.58 のみが本発明に関するステロール基

特開昭56-8399(5)

質に対し所望の 7α-ヒドロキシル化を行い得ることがわかつた。

該生物は培養液、菌系体またはその酵素抽出液の形で使用できる。培養液は適当なメジウム中に該生物を接種して調製できる。培養メジウムには炭素源、窒素源、無機塩および該生物の生育に適当な他の栄養素を添加できる。炭素源はたとえばグルコース、スクロース、デキストリン、マンノース、デキサン、乳糖、グリセロール等、窒素源はたとえばペプトン、肉抽出液、イースト抽出液、コーンステイプ液、カゼイン等のような窒素含有有機物質、硝酸塩、無機アンモニウム塩等の上うる窒素含有無機物質、無機塩はたとえばリン酸塩またはナトリウム、カリウム、マグネシウム、マンガン、鉄、銅等のようなミネラルである。

本発明のこの工程に用いられる培養方法としては、深部培養、振盪培養、静置培養等がある。しかしながら、本発明に用いられる該生物は有気条件を要求するので、通気を促進する条件下に培養するのが好ましい。

15

16

さらに本発明を実施するにあたつては、該生物の培養液から単離された糸菌体または培養液もしくは糸菌体からそれ自体公知の方法で抽出した粗酵素抽出液を適当な条件下に基質と接触させることもできる。この種の実験結果を採用すれば、緩衝液、生理食塩水または無塩メジウムのような水溶液、あるいは水中で 7α-ヒドロキシル化が有利に行われる。基質は微粉末の形または親水性液体たとえばアセトン、ジメチルスルホキサイド、メタノール、エタノール、エチレングリコール、プロピレングリコール、ジオキサン等に溶解した溶液として添加する。また基質の水溶液溶液に界面活性剤または分散剤を加えてよい。さらに、基質の微細懸濁液を超音波を使用して調製してもよい。

発酵には常法を利用できる。すなわち所望の微生物をエダミン培地（以下に述べる発酵培地と同じ）中、1日ないし72時間、約15ないし35℃の温度で生育させることができる。発酵は通常の発酵メジウムに1ないし10重量%の栄養増殖

物を接種して開始させる。発酵条件は種の生育に用いたと同一でよい。18ないし96時間の培養期のうちに、基質のビスノルコレノールを好ましくは無水エタノール中溶液として、あるいは0.1ダツイーン8g（ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート）中超音波調製溶液として加える。発酵は基質添加後120時間まで行われる。適当な発酵メジウムは以下の物質またはその倍量を混合することにより得られる。すなわち、エダミン（Edamin, Sheffield Chemical Co.）、ラクトアルブミンの酵素消化物20g、コーンステイプ液3g、デキストロース50gに水を加えて最終容量1.6とする。メジウムのpHは該菌たとえばオートクレービングの前に約4ないし7好ましくは約5.0に調整する。

発酵メジウムからの所望の 7α-ヒドロキシ-5-ケト-ビスノルコレノール生成物の単離は本技術分野においてよく知られた方法を用いて容易に実施できる。すなわち、収穫後培養液を非混和性有機溶媒たとえば好ましくは酢酸エチルによつ

17

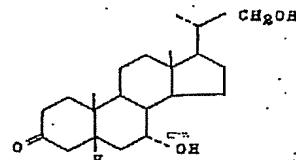
18

て抽出する。溶媒可溶性フラクションを次にゲルクロマトグラフィーとすればシリカゲルG-60を用い、ついで結晶化して精製する。

さらに発酵液からの所望の生成物の収率を向上させるために多くの操作を採用できることも明らかにされた。たとえば $2:2'$ -ジビリジルのようなキレート剤の最終濃度 $0.5 \times 10^{-4} M$ ないし $0.75 \times 10^{-3} M$ の添加、グルコースまたはスクロース基質の最終濃度約5%の添加、基質添加後のインキュベーション発酵温度の約24℃への降下、また基質の1ターン8日中5ターン度への膨潤等である。発酵メジウムに吸着剤を添加することにより、さらに高い収率が達成できる。たとえばアンバーライト(Amberlite) XAD7(Rohm & Haas Co.)、アクリル酸メチルエステルポリマーのような重合樹脂吸着剤を、基質濃度約1.8%までの発酵メジウムに0.3-0.6重量%濃度で加えると、収率が改善される。吸着剤濃度約0.6重量%で最高の収率改善が達成できる。

上記発酵操作によつて製造される7α-ヒドロ

特開昭56-8399(6)
キシ-3-ケト-ビスノルコレノールを次に接触
水素添加して、式



で示される(5β)-7α,22-ジヒドロキシ-23,24-ビスノルコレラン-3-オンを製造する。

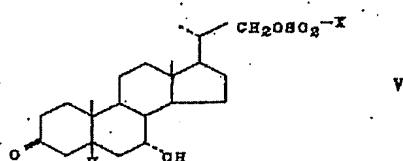
この水素添加に適した触媒は好ましくは固体支持体につけたパラジウム、好ましくは5%パラジウム黒である。この反応は非水性極性溶媒たとえばジメチルホルムアミド中、約0ないし50℃好ましくは恒温槽温、常圧で実施される。生成物の単離は上述の発酵液からの場合と同様に、すなわちシリカゲル60を用いたゲルクロマトグラフィーおよび結晶化に行われる。

式IVの飽和生成物を次にアートリルまたはメチルスルホニルハライドと78ないし0℃好ましく

19

20

は-10℃の温度で反応させる。反応は窒素含有有機溶媒たとえばピリジン中で行うのが便利である。この反応の好ましい反応剤はアートルエンスルホニルクロライドである。この反応で得られた生成物は上述の化合物について述べたと同じ方法で単離できる。生成物は次式で表すことができる。

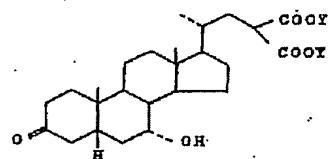


(式中Xはメチルまたはアートリル、好ましくはアートリルである)。

式Vの化合物の好ましい例は(5β)-7α-ヒドロキシ-22-(4-メチルフェニル)スルホニルオキシ-23,24-ビスノルコレラン-3-オンである。

本発明の次の工程では、式Vの化合物をマロン酸ジC1-5アルキルエステルのナトリウム塩好ましくはマロン酸ジメチルエステルのナトリウム塩

と、たとえばジメチルホルムアミドのような極性非水溶媒中、0ないし100℃好ましくは約50℃において、脱気を除いた不活性雰囲気下と反応させる。マロン酸ジC1-5アルキルエステルのナトリウム塩はジメチルホルムアミド中マロン酸エステルに水素化ナトリウムの溶液を加えることによりin situで調製できる。目的生成物の単離は前述の操作と同様にして行う。得られた生成物は次の構造を有する。



(式中XはC1-5アルキル、好ましくはメチルである)。

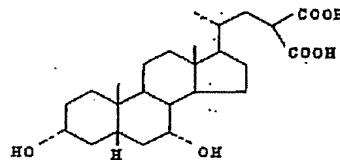
式VIの化合物の好ましい例は(5β)-24-ノルコレラン-7α-オール-3-オン-23,23-ジカルボン酸ジメチルエステルである。

式VIの化合物を次に、式

21

22

式Ⅳのジオールを次に強塩基たとえば水素化パリウムの存在下に還流して加水分解し、後処理後酸性にすると、式

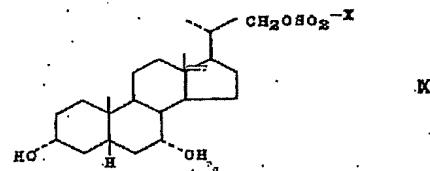


(式中 R は C_{1-3} アルキル、好ましくはメチルである)で示される相当する3-ヒドロキシ化合物に還元する。

式Ⅳの化合物の好ましい例は(5β)-24-ノルコラン-3α,7α-ジオール-23,23-ジカルボン酸ジメチルエステルである。

この還元操作は通常の化学還元剤たとえば水素化ホウ素ナトリウムを用い、含水 C_{1-3} アルカノール溶媒たとえば95%エタノール中、0ないし5.0%好ましくは室温、常圧で実施される。反応生成物は、反応混合物を酸性にし、ハロゲン化炭化水素溶媒たとえばジクロロエタンで抽出して単離する。溶媒を除去すると粗生成物が得られ、これをさらに精製することなくそのまま次工程に使用できる。

7.8%ないし室温、好ましくは約-1.0%において、不活性有機溶媒たとえば環状エーテル好ましくはテトラヒドロフラン中、不活性雰囲気下、処理して、式

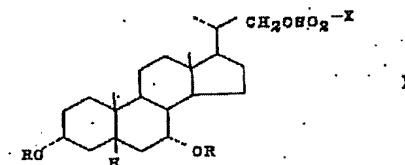


(式中 X は先に定義したと同じである)で示されるジオールが生成する。

式Xの化合物の好ましい例は2-[[(4-メチルフェニルスルホニル)オキシ]-23,24-ビスノルコラン-3α,7α-ジオールである。

次工程では式Xの化合物をステロイド化学においてヒドロキシ保護基として慣用されているアシル化剤の2倍モル以上の過剰と反応させ、相当するジアシル化合物に導く。適当なアシル化剤としては C_{2-6} 低級アルカン酸の無水物、好ましくは

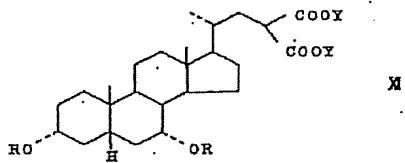
無水酢酸がある。アシル化はアミン塩基たとえば4-ジメチルアミノピリジンの存在下、ピリジンのような適当な有機溶媒中で容易に実施できる。得られたジアシル生成物は次式の構造を有する。



(式中 X は先に定義したと同じであり、 R はアシルである)

式XIの化合物の好ましい例は22-[(4-メチルフェニル)スルホニル]オキシ-23,24-ビスノルコラン-3α,7α-ジオール-3,7-ジアセテートである。

式XIのジアシル化合物を次にマロン酸ジ C_{1-5} アルキルエステルのナトリウム塩、好ましくはマロン酸ジエチルエ斯特ルのナトリウム塩と、化合物Vの化合物Vへの変換の場合と全く同様に反応させて、式



(式中 R および Y は先に定義したと同じである)
で示される化合物を製造する。

式 X の化合物の好ましい例は $3\alpha, 7\alpha$ -ジセトキシ-24-ノルゴラン-23, 23-ジカルボン酸ジエチルエステルである。

式 X の化合物を上述の式 Y のジカルボン酸に交換する工程は、強塩基たとえばアルカリ金属水酸化物溶液好ましくは水酸化カリウムにより、加熱下好ましくは還流温度で加水分解することにより行われる。この反応は、1種または2種以上の低級アルカノールたとえばメタノール、イソプロパノールまたはその混合物のような溶媒を用いて行うことができる。

本発明の方法および中間体について以下の実施例によりさらに詳細に説明する。

例 1

$(5\beta)-7\alpha, 22$ -ジヒドロキシ-23, 24-ビスノルコール-4-エン-3-オン (7 α -OH-3-KC)

発酵操作 培養は以下のメジウムにより維持した。細菌、グルコース栄養寒天培地；菌、 Babourand Dextrose 寒天培地 (BD) (Difco)；放線菌、デンプン-カゼイン寒天培地。増殖接種物は Babourand Dextrose プライヨン (Difco) または発酵段階で使ったメジウム中で調製した。後者の組成は、エダミン (Edamin : Sheffield Chemical Co.) 20 g、コーンステイプ液 3 g、デキストロース 50 g で、蒸留水で最終容量 1.0 とした。pH はオートクレーブでの滅菌前 pH 6.2 で 5.0 に調整した。発酵はそれぞれ、メジウム 50 mL および 100 mL を含む 250 mL または 500 mL エrlenmeyer フラスコ中で実施した。フラスコに接種メジウム中、250 RPM ロータリーシェーカー (振心率 5 cm) 上 28 °C で 72 時間生育させた培養液から栄養増殖物 (5 %) を接種した。とく

に指示のない限り、発酵段階にも同じ条件を採用了。48 時間インキュベーション後、3-ケト-1-ビスノルコレノール (3-KC) を 3 % エタノール溶液、または超音波処理 (Branson Sonifier Cell Disruptor 200) で調製したツイーン 80 (Atlas Chemical Industries) 0.1 % 溶液中 5 % 脱脂液として加えた。基質添加後 120 時間までインキュベーションを続けた。

32 種から 75 種の菌、5 属から 6 種の放線菌、および 3 属から 2 種のグラム陰性菌、1 属から 3 種のグラム陽性菌 (計 152 培養) について、3-KC の 7α -OH-3-KC への変換能を試験した。このスクリーニングの結果、わずか 7 培養で所望の変換能が認められた。同じ属でも、また場合によつては同じ種に属する菌株でも、基質に所望の変換を行い得るかどうかは一定しなかつた (表 1)。

表 1

培養微生物	由来コード	7α -OH-3-KC
<u>Botryodiplodia theobromae</u>	I F O 6 4 6 9	+
	D S M 6 2 - 6 7 8	+
	D S M 6 2 - 6 7 9	+
<u>Lasiocladia theobromae</u>		
(<u>Botryodiplodia theobromae</u>)	A T C C 2 8 5 7 0	+
<u>Lasiocladia theobromae</u>		
(<u>Diplodia theobromae</u>)	A T C C 9 0 5 5	0
<u>Lasiocladia theobromae</u>		
(<u>Diplodia theobromae</u>)	A T C C 1 0 9 3 6	0
<u>Lasiocladia theobromae</u>		
(<u>Botryodiplodia theobromae</u>)	A T C C 1 6 9 3 1	0
<u>Lasiocladia theobromae</u>		
(<u>Botryodiplodia theobromae</u>)	A T C C 2 6 1 2 3	0
<u>Diplodia natalensis</u>	A T C C 9 0 5 5	0
<u>Diplodia Zeæ</u>	Q M 6 9 8 3	0
<u>Botryodiplodia malorum</u>	C B S 1 3 4 5 0	0
<u>Botryosphaeria ribis</u>	A T C C 2 2 8 0 2	+
" <u>berengeriana</u>	A T C C 1 2 5 5 7	+
" " <u>rhodina</u>	C B S 3 7 4 5 4	+
" " "	C B S 2 8 7 4 7	+
" " "	C B S 3 0 6 5 8	+
" " <u>corticis</u>	A T C C 2 2 9 2 7	0

30

Botryodiplodia theobromae I F O 6 4 6 9 Kについての振盪培養実験から、キレート剤 $2,2'$ -ジピリジルを 0.5×10^{-4} ないし 0.75×10^{-3} M最終濃度の範囲で添加すると生成物の収率を増加できることが明らかになかつた。

また、基質を添加する48時間目にははじめ培養液に加えたグルコースは枯渇していることがわかつた。この時点でグルコースまたはスクロース(最終濃度5%)を添加すると、3-KCおよび 7α -OH-3-KCの分解を低下させた。48時間目に温度を24℃に低下させること、D.1%クイーン80に超音波処理で懸濁させた基質の5%を懸濁液を用いることでも収率をわずかに改善した。このすべての改良条件を合わせると、3-KCの 7α -OH-3-KCへの25%の変換が達成でき、未反応3-KC46%の存在が認められた(高圧液体クロマトグラフィー、HPLCによる分析)。

発酵液に吸着剤を添加すると、もつとも著しい収率の改良が達成された。Botryodiplodia

theobromae I F O 6 4 6 9株の発酵液にアンバーライト X A D - 7, 0.3 - 0.6%を添加すると 7α -OH-3-KCの収率の増加がみられた。この生成物の増加は3-KC濃度1g/lまで認められ、これ以上高い基質濃度ではXAD-7の効果はなかつた。同様にXAD-7を0.6%を越えて加えてもそれ以上収率が上昇することはなかつた。使用前にXAD-7樹脂をアセトン中で2.5時間遅流し、ついで痕跡のアセトンおよび色が消失するまでくり返し蒸留水で洗浄し、40℃で乾燥した。

基本的発酵操作にわずかの改良を加えて、Lasiocladia theobromae 培養液を用いて3-KCの 7α -ヒドロキシル化を行つた。発酵液のHPLC分析から、この微生物は収率25%、残存基質22%という結果を示した。

3-KCの変換生成物の確認は、両培養液から単離された物質について、以下の方法で実施した。

7α -OH-3-KCの単離：3-KC 1gを添加した発酵の収穫全培養液2lを2回、各回1

6の酢酸エチルで抽出した。抽出液を合し、0.5%に濃縮し、ガラスウールを通して汎過した。汎液を蒸発乾固し、残渣を150mLの熱酢酸エチルに再溶解した。室温に冷却したのち、不溶性フラクションを再び汎去した。汎液を蒸発させて35mLに濃縮し、シリカゲルG-60、200gを充填した29cmのカラムに適用した。カラムを酢酸エチルで展開し、7α-0H-3-EtCに富むフラクションを合し、濃縮し、シリカゲルG-60上、メチレンクロライド、酢酸エチル、ヘキサン(1:1:1)で展開して再クロマトグラフィーに付した。7α-0H-3-EtCに富むフラクションを再び合し、酒媒を蒸発させて除き、少量の酢酸エチルから再結晶すると生成物が得られた(*Botryodiplodia* 培養液から220mg)。

Lasiodiplodia 培養液から185mg)。7α-0H-3-EtCとしての同定は、7α-0H-3-EtCの合成標品との比較によつた。融点199-200°C(標品197.5°-200°C)、混融(融点降下なし)、IR、MS、マススペクトル、旋光度

も一致した。

分析: とくに指示のない限り、3-EtCおよび7α-0H-3-EtCの定量分析は薄層クロマトグラフィー(TLC)によつた。分析は発酵サンプルの酢酸エチル抽出液について実施した。抽出液を40°Cで蒸発乾固し、はじめのサンプル容量の10分の1以下の3-Mエタノールに再溶解した。クロマトグラフィーはシリカゲルF254 TLC板(B. Merck, Darmstadt, Germany)で行い、酢酸エチルで展開した。展開板を風乾し、スポットを短波長紫外線(254nm)で確認した。基質および生成物のこのTLC系におけるRf値はそれぞれ0.75および0.36であつた。0.36より小さいRf値を示す少量の生成物がクロマトグラム上に認められたが、これを所望の生成物から分離するには同一溶媒系での展開をくり返すことが有効であつた。

スポット中の物質の定量分析は、板からスポットの領域を注意深くかき取り、試験管にとつて、一夜3-Mエタノール5mLで溶出した。蔵出し液の成

光度を Gilford 250 比色計で測定し、この値を3-EtCおよび7α-0H-3-EtC標品の既知量のクロマトグラフィーによつて得られた標準曲線と比較した。TLCの結果はスポットの螢光を測定しても定量できず(Zeiss TLCスペクトロフォトメーター, ZM 800)。

高压液体クロマトグラフィー(HPLC)分析は、メチレンクロライド中20%ジオキサンで展開したシリカゲル(日R-I-10)カラム上で実施した。カラムは254nm検出器でモニターした。

例2

(5β3-7α, 22-ジヒドロキシ-23, 24-ビスノルコラン-3-オン

7α, 22-ジヒドロキシ-23, 24-ビスノルコール-4-エン-3-オン 1.92g
(0.0055モル)を新たに蒸留した乾燥ジメチルホルムアミド25mLに溶解し、この溶液に5%パラジウム黒0.19gを加えた。この懸濁液を水素下、室温で5.5時間搅拌した。水素の吸収は

1.08mL(理論量124mL)で止まつた。熱媒を汎去し、酢酸エチル200mLで洗浄した。汎液を水1L中に注ぎ、酢酸エチル5×250mLで抽出した(乳化を防止するため飽和食塩水を添加)。酢酸エチル抽出液を合し、水5×250mL、ついで飽和食塩水2×250mLで洗浄した。酢酸エチル溶液を硫酸ナトリウムで乾燥し、真空中で蒸発させると、粗(5g)-7α, 22-ジヒドロキシ-23, 24-ビスノルコラン-3-オン2.13gが得られた。生成物を150gのシリカゲル60上クロマトグラフィーに付し、酢酸エチルで溶出した。生成物フラクション1.7gを30.0gのシリカゲル60上再クロマトグラフィーに付し、酢酸エチル/メチレンクロライド(2:1)混合溶媒で溶出すると、(5β)-7α, 22-ジヒドロキシ-23, 24-ビスノルコラン-3-オン1.29.8(6.7%)が得られた。分析サンプルは酢酸エチルから再結晶した。融点132-133°C, [α]_D²⁵ = +15.4 (C 1.01, CHCl₃), C₂₈H₃₆O₃として計算値 C 75.82, H 10.41,

分析値 C 76.10, H 10.69。

例3

(5β)-7α-ヒドロキシ-22-[[(4-メチルフェニル)スルホニル]オキシ]-23,24-ビスノルコラン-3-オン

(5β)-7α,22-ジヒドロキシ-23,24-ビスノルコラン-3-オン 1.0g

(0.00286モル)を-10℃に冷却した無水ピリジン20mlに溶解した液にエートルエシスルホニクロライド2.168(0.0114モル)を加えた。この溶液を-10℃で1時間攪拌し、ついで冷蔵庫に一夜放置した。反応混合物を次に0.25%重炭酸ナトリウム溶液400ml中に注ぎ酢酸エチル4×100mlで抽出した。酢酸エチル抽出液を合し、1%重炭酸ナトリウム3×100ml、水3×100ml、1%塩酸3×100mlで順次洗浄し、最後に中性になるまで水洗した。硫酸ナトリウムで乾燥したのち、酢酸エチル溶液を蒸発させ、得られた粗生成物1.548を150gのシリカゲル60上クロマトグラフィーによ

り精製した。ベンゼン/酢酸エチル(4:1)で溶出すると(5β)-7α-ヒドロキシ-22-[[(4-メチルフェニル)スルホニル]オキシ]-23,24-ビスノルコラン-3-オン 1.15g(収率80%)が得られた。分析サンプルはトルエン/ヘプタンから再結晶した。融点157-160℃; [α]_D²⁵=+12.7(C 0.994, CHCl₃)、計算値 C 69.29, H 8.42, 分析値 C 69.55, H 8.47.

例4

(5β)-24-ノルコラン-7α-オール-3-オシ-23,23-ジカルボン酸メチルエス
タル

室温、アルゴン雰囲気下、乾燥ジメチルホルムアミド5mlに5.7%水素化ナトリウム30mg(0.0007モル)、ついでイリコン酸ジメチルエスチル0.0668(0.0005モル)のジメチルホルムアミド1ml溶液を加えた。1.5時間40-50℃で搅拌したのち、(5β)-7α-ヒドロキシ-22-[[(4-メチルフェニル)スルホ

37

ニル]オキシ]-23,24-ビスノルコラン-3-オン0.251g(0.0005モル)を加えた。反応混合物を1時間直立で搅拌し、油浴中で18時間50℃に加熱し、ついで水25ml中に注いだ。酢酸エチル4×10mlで抽出したのち、水、飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、蒸発させ、粗生成物0.208を得た。2.0gのシリカゲル60上クロマトグラフィーに付し、クロロメタン/酢酸エチル(2:1)混合物で溶出すると、(5β)-24-ノルコラン-7α-オール-3-オシ-23,23-ジカルボン酸ジメチルエスチル0.041g(収率17%)が得られた。

例5

(5β)-24-ノルコラン-3α,7α-ジオール-23,23-ジカルボン酸ジメチルエス
タル

(5β)-24-ノルコラン-3-オシ-23,23-ジカルボン酸ジメチルエスチル0.195g(0.00042モル)の95%エタノール12ml溶液に、室温、アルゴン雰囲気下、水素化ホウ素

ナトリウム0.025g(0.00065モル)を加えた。反応混合物を2時間搅拌し、ついで1%塩酸4mlを含む水50ml中に注いだ。この水溶液をジクロロメタンで抽出し、抽出液を合して硫酸ナトリウムで乾燥し、蒸発せると粗生成物0.195gが得られた。

例6

(5β)-24-ノルコラン-3α,7α-ジオール-23,23-ジカルボン酸

粗(5β)-24-ノルコラン-3α,7α-ジオール-23,23-ジカルボン酸ジメチルエスチル0.195gのエタノール5ml溶液に水2mlついで水酸化カリウム0.80gを加えた。この溶液を3時間還流加熱し、室温に冷却し、ついで1%塩酸を加えて酸性にした。ジクロロメタンで抽出、乾燥、溶液を蒸発させると(5β)-24-ノルコラン-3α,7α-ジオール-23,23-ジカルボン酸0.135gが得られた。

例7

ケノザオキシコール酸

39

40

アルゴン雰囲気下、丸底フラスコ中で(5g)
 -24-ノルコラン-3α, 7α-ジオール-
 23, 23-ジカルボン酸0.135g(0.00031
 モル)を190-205℃に10分間加熱した。
 気体の発生が認められた。冷却後、残留物を10
 gのシリカゲル6g上クロマトグラフィーに付し
 脂肪エチル中10%エタノールで溶出するとケノ
 デオキシコール酸がガラス状物質として得られた。
 T.L.C.およびIRは標品と一致した。

例8

22-[[(4-メチルフェニル)スルホニル]
 オキシ]-23, 24-ビスノルコラン-3α,
 7α-ジオール
 (5g)-7α-ヒドロキシ-22-[[(4-
 メチルフェニル)スルホニル]オキシ]-23,
 24-ビスノルコラン-3-オン0.350g
 (0.00069モル)を乾燥テトラヒドロフラン
 10mlにとり、アルゴン雰囲気下、-10℃に冷
 却し、水素化リチウムアルミニウムトリセーテ
 トキサイド0.391g(0.00138モル)の乾

41

特開昭56-8399(12)
 煙テトラヒドロフラン5ml溶液を滴加した。1.5
 時間後、1N塩酸2mlを加えて反応を止めた。テ
 ラヒドロフランを真空中で除去した。残留物を
 水50mlにとり、脂肪エチル3×40mlで抽出し
 た。脂肪エチル抽出液を合して中性になるまで水
 洗し、無水硫酸ナトリウム上で乾燥した。混合物
 を済過し、溶媒を真空中で除去すると、粗生成物
 0.374gが得られた。これをろ7gのシリカゲ
 ル6g上クロマトグラフィーに付し、脂肪エチル
 で溶出すると、22-[[(4-メチルフェニル)
 スルホニル]オキシ]-23, 24-ビスノルコ
 ラン-3α, 7α-ジオール0.290g(88%)
 が得られた。分析サンプルはイソプロパノール/
 水から再結晶した。融点87-89℃, $[\alpha]_D^{25} =$
 +8.25(c, 0.9933, CHCl₃), C₂₈H₄₄O₈
 として計算値C 69.01, H 8.79, D 6.35,
 分析値C 69.21, H 8.88, D 6.07。

例9

22-[[(4-メチルフェニル)スルホニル]
 オキシ]-23, 24-ビスノルコラン-3α,

42

7α-ジオール-3, 7-ジアセテート

22-[[(4-メチルフェニル)スルホニル]
 オキシ]-23, 24-ビスノルコラン-3α,
 7α-ジオール0.290g(0.00049モル)
 無水酢酸0.6ml(0.0064モル)、乾燥ビリジ
 ン0.6ml(0.0074モル)、4-ジメチルアミ
 ノピリジン0.003g(0.000025モル)お
 よび乾燥トルエン10mlの混合物を一夜、アルゴ
 ン雰囲気下に攪拌した。この混合物を0.5N塩酸
 50mlで酸性にし、脂肪エチル3×20mlで抽出
 した。脂肪エチル抽出液を中性になるまで水洗し
 ついで無水硫酸ナトリウムで乾燥した。混合物を
 済過し、溶媒を真空中で除去すると粗生成物
 0.311gが得られた。これをメタノールから再
 結晶すると、22-[[(4-メチルフェニル)
 スルホニル]オキシ]-23, 24-ビスノルコ
 ラン-3α, 7α-ジオール3, 7-ジアセテー
 トの第一の結晶0.2577g(76%)が得られた。
 母液を蒸発させると生成物0.065g(19
 %)が得られ、TLCによる純度は95%以上で

43

ある。分析サンプルはメタノールから再結晶した。
 融点174-175℃, $[\alpha]_D^{25} = +7.41$ (c,
 0.8768; CHCl₃), C₂₉H₄₈O₈として計算値
 C 67.32, H 8.22, 分析値C 67.34, H
 8.33。

例10

5α, 7α-(ジアセトキシ)-24-ノルコ
 ラン-23, 23-ジカルボン酸ジエチルエステ
 ル

水素化ナトリウム50%油懸濁液0.264g
 (0.0055モル)をアルゴン雰囲気下、乾燥ペ
 ンタン3×3mlで洗浄した。ついで乾燥トルエン
 5mlを加えた。マロン酸ジエチルエステル1.056
 g(0.0066モル)の乾燥トルエン5ml溶液を
 滴加し、ついで還流加熱して、22-[[(4-
 メチルフェニル)スルホニル]オキシ]-23,
 24-ビスノルコラン-3α, 7α-ジオール
 3, 7-ジアセテートの乾燥トルエン10ml溶液
 を滴加した。この混合物を20時間還流加熱した。
 さらにマロン酸ジエチルエステル0.49g

44

(0.003モル)および洗浄(ベンタン)水素化ナトリウム0.050g(0.001モル)を加え、混合物を還流加熱した。5時間後、冷混合物を水100ml中に注ぎ、酢酸エチル3×60mlで抽出した。酢酸エチル抽出液を合し、中性になるまで水洗し、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。混合物を沪過し、真空中で溶媒を除去すると、残留物1.114gが得られた。これを100gのシリカゲル60上クロマトグラフィーに付し、メチレンクロライド/酢酸エチル(9:1)で溶出すると $[\alpha]_D^{25} = +23.97$ (c, 1.0679 CHCl_3)、 $C_{55}H_{52O_8}$ として計算値C 68.72, H 9.09、分析値C 68.92, H 9.00。

例1-1

3α, 7α-ジヒドロキシ-24-ノルコラン-23, 23-ジカルボン酸

45

メタノール3ml、イソプロパノール5mlおよび水酸化カリウム0.779g(0.0139モル)の溶液に3g, 7α-(ジアセトキシ)-24-ノルコラン-23, 23-ジカルボン酸ジエチルエステル0.350g(0.0006モル)を加えた。この混合物をアルゴン雰囲気下に4時間還流加熱し、ついで室温で一夜搅拌した。アルコール溶媒を真空中で除去し、混合物を水50ml中に注ぎ、ジエチルエーテル3×25mlで洗浄した。水層を酸性にし、沈殿を吸引沪過して集めた。粗ジ酸0.252g(96%)が得られた。融点20.5°C。(分解)。これはさらに精製することなくそのまま次回工程に用いた。
1字跡

例1-2

ケノヂオキシコール酸

3α, 7α-ジヒドロキシ-24-ノルコラン-23, 23-ジカルボン酸0.125g(0.00028モル)、キシレン5mlおよび乾燥ビリジン1mlの混合物を1時間還流加熱した。混合物を冷却し、溶媒を真空中で除去し、残留物を

46

第1頁の続き

⑦発明者 ミラン・アール・ウスココビツク
アメリカ合衆国ニュージャージー州アツバー・モントクレー・ハイランド・アベニュー253

酢酸エチル25mlに溶解した。酢酸エチル溶液を1g塩酸3×10mlで洗浄し、ついで中性になるまで水洗した。酢酸エチル抽出液を無水硫酸ナトリウムで乾燥し、沪過し、真空中で溶媒を除去すると、粗生成物0.111gが得られた。これをヘキサン/酢酸エチルから再結晶すると、第一の結晶0.086g(76%)が得られ、これは標品ケノヂオキシコール酸と同じスペクトルを示し、混融して融点降下をみなかつた。分析サンプルはシリカゲル60上クロマトグラフィーに付し、メチレンクロライド/メタノール/ヘキサン(2:1:1)で溶出し、ついで酢酸エチルから再結晶して調製した。

代理人 浅村 勉

47

手 続 補 正 書 (自発)

昭和55年7月10日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和55年特許権第 47936号

2. 発明の名称

ケノデオキシコール酸の製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所

氏 名 エフ・ホフマーシュ・ロシユ・ウント・コンパニー
(名 称) ブクチエンゲゼルシャフト

4. 代理人

居 所 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新 大 手 町 ビ ル デ ン グ 3 3 1
電 話 (211) 3 6 5 1 (代表)

氏 名 (6669) 浅 村 皓

5. 補正命令の日付

昭 和 年 月 日

6. 補正により増加する発明の特許号

55.7.10

7. 補正の対象

明細書



8. 補正の内容 別紙のとおり

明細書の添付 (内容に変更なし)。